

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 199 56 568.6

**Anmeldetag:** 24. November 1999

**Anmelder/Inhaber:** Dr. Roland K r e u t z e r , Weidenberg/DE;  
Dr. Stefan L i m m e r , Bayreuth/DE.

**Bezeichnung:** Verfahren und Medikament zur Hemmung der Ex-  
pression eines vorgegebenen Gens

**IPC:** C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. Mai 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

**Wehner**

## **Verfahren und Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren nach dem Oberbegriff des  
5    Anspruchs 1. Sie betrifft ferner ein Medikament und eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide.

Ein solches Verfahren ist aus der nachveröffentlichten WO  
99/32619 bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hem-  
10    mung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 50 Basen aufweist. Zur Erzielung einer effizienten Hemmung ist eine Länge der identischen Sequenz von 300  
15    bis 1000 Basenpaare erforderlich. Der Herstellungsaufwand eines solchen Oligoribonukleotids ist hoch.

Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines  
20    sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-RNA handelt es sich um ein RNA-Molekül das komplementär zu Bereichen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbesondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B.  
25    Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt werden. - Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

30

Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlgepaarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive fehlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären

Komplexes mit einem oberflächenaktiven Mittel enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die Einzelstränge gehen nicht-reguläre, sog. "Nicht-Watson-Crick"-Basenpaarungen miteinander ein, so daß fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn nicht-sequenzspezifische dsRNA in die Zellen eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer Induktion von Interferon, wodurch die Virusvermehrung gehemmt werden soll. Der hemmende Effekt bzw. die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.

Aus Fire, A. et.al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, daß dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, daß die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA bzw. durch sie induzierte Enzyme zurückzuführen ist. - Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in Säugerzellen und humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst effizientes Verfahren, Medikament bzw. eine möglichst effiziente Verwendung zur Herstellung eines Medikaments angegeben werden, mit dem/der eine besonders wirksame Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens bewirkbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 33, 34 und 66 und 67 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 32, 35 bis 65 und 68 bis 100.

- 5 Nach Maßgabe der verfahrensseitigen Erfindung ist vorgesehen, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaare aufweist.

10 Bei den erfindungsgemäßen Oligoribonukleotiden handelt es sich um solche, die zumindest abschnittsweise eine definierte Nukleotidsequenz aufweisen. Der definierte Abschnitt kann auf den komplementären Bereich beschränkt sein. Es kann aber auch sein, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid insgesamt eine definierte Nukleotidsequenz aufweist.

15 Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs von höchstens 49 Basenpaaren eine wirksame Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können  
20 mit geringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

Insbesondere dsRNA mit einer Länge von mehr als 50 Nukleotidpaaren induziert in Säugerzellen und humanen Zellen bestimmte zelluläre Mechanismen, z.B. die dsRNA-abhängige Proteinkinase oder das 2-5A-System. Das führt zum Verschwinden  
25 des durch die eine definierte Sequenz aufweisende dsRNA vermittelten Interferenzeffektes. Dadurch wird die Proteinbiosynthese in der Zelle blockiert. Insbesondere dieser Nachteil wird durch die vorliegende Erfindung beseitigt.

30 Weiterhin ist die Aufnahme von dsRNA mit kurzer Kettenlänge in die Zelle bzw. in den Zellkern gegenüber längererkettigen dsRNAs deutlich erleichtert.

Sofern dsRNA als Wirkstoff benutzt wird, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, daß die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA kann  
 5 gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen der dsRNA in vorgegebene Zielzellen.

10

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare auf. Die dsRNA kann also länger als der zum Zielgen komplementäre Bereich sein. Der komplementäre Bereich kann endständig angeordnet  
 15 oder in die dsRNA eingeschaltet sein. Eine solche dsRNA bzw. ein zur Kodierung derselben vorgesehener Vektor können synthetisch bzw. enzymatisch mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

20 Das zu hemmende Gen wird zweckmäßigerweise in eukaryontischen Zellen exprimiert. Das Zielgen kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen. Es kann auch in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert werden. Es kann  
 25 Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein. - Das vorgeschlagene Medikament erlaubt die Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs, viraler Erkrankungen oder Morbus Alzheimer.

30 Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erlaubt das erfindungsgemäße Medikament auch die Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet wird.

Die Enden der dsRNA können modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Eine Dissoziation tritt insbesondere bei Verwendung niedriger Konzentrationen oder kurzer Kettenlängen auf. Zur besonders wirksamen Hemmung der Dissoziation kann der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. - Eine erfindungsgemäße dsRNA, deren Dissoziation vermindert ist, weist eine höhere Stabilität gegen enzymatischen und chemischen Abbau in der Zelle bzw. im Organismus auf.

Insbesondere bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors kann der komplementäre Bereich aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet wird. Die Nukleotide sind im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau zweckmäßigerweise chemisch modifiziert.

Die chemische Verknüpfung wird zweckmäßigerweise durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet. Sie kann nach einem besonders vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal an mindestens einem, vor-

zugsweise an beiden, Ende/n des komplementären Bereichs hergestellt werden.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, daß die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind. Die chemische Verknüpfung kann auch durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet werden. Von Vorteil ist es ferner, daß die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereiche eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird. Sie kann außerdem durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet werden.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, daß zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen. Ferner kann die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet werden. Vorzugsweise wird die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt.

Die chemische Verknüpfung kann zweckmäßigerweise durch ultraviolette Licht induziert werden.

Nach einer weiteren besonders vorteilhaften Ausgestaltung ist vorgesehen, daß die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch herge-

stelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird. Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Es kann das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthalten. - Die vorgenannten Merkmale erleichtert wesentlich das Einführen der dsRNA in die Zelle.

Vorzugsweise ist bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt. Das gebildete Konstrukt ist besonders stabil.

Die dsRNA kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein.- Die Zelle kann eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ferner ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Es hat sich überraschend gezeigt, daß eine solche dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in humanen Zellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumin-



dest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Das vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

5

Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weist der komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare auf. - Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs von  
10 höchstens 49 Basenpaaren eine effiziente Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit geringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

15 Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Überraschenderweise  
20 eignet sich eine solche dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die  
25 erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht also die Herstellung besonders wirksamer Medikamente.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide  
30 (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem

Gen ist. - Die Verwendung eines Vektors ermöglicht eine besonders wirksame Gentherapie.

Hinsichtlich vorteilhafter Ausgestaltungen des Medikaments und der Verwendung wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

#### Ausführungsbeispiel:

Mittels herkömmlicher Verfahren ist ein aus dem einzigen Sequenzprotokoll ersichtlicher RNA-Einzelstrang enzymatisch synthetisiert worden.

Ferner ist der dazu komplementäre RNA-Einzelstrang synthetisiert worden. Anschließend sind der Einzelstrang und der dazu komplementäre Einzelstrang zur dsRNA vereinigt worden. Die so hergestellte dsRNA enthält eine bestimmte DNA-Sequenz unter der Kontrolle des "immediate early gene"-Promotors des Cytomegalievirus.

#### Versuchsprotokoll:

Es wurde ein Plasmid-Vektor konstruiert, unter dessen Verwendung die benötigte dsRNA hergestellt werden konnte. Für dessen Konstruktion wurden wurden Oligodesoxyribonukleotide als Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, von denen eines die Sequenz einer *EcoRI*-Schnittstelle und des T7-RNA-Polymerase-Promotors (5'-GGA ATT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA TCA GAT CTC TAG AAG-3'), das andere die einer *BamHI*-Schnittstelle und des SP6-RNA-Polymerase-Promotors (5'-GGG ATC CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC CCA TGA TCG CGT AGT CGA TA-3') enthielt. Darüber hinaus enthielten diese Primer an ihren 3'-Enden identische bzw. komplementäre Bereiche zur käuflich erwerblichen "positive control DNA" des HeLaScribe®

Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega, die auch als Matrize für die PCR diente. Die Länge des so amplifizierten DNA-Fragmentes betrug 400 Basenpaare, wobei 340 Basenpaare der "positive control DNA" entsprachen. Nach PCR wurde das Produkt mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Als Klonierungsvektor für das erhaltene PCR-Produkt diente der Vektor pUC18. Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue. Plasmid-DNA eines ausgewählten Klons, deren Sequenz durch partielle Sequenzierung überprüft worden war, wurde mit *EcoRI* bzw. *BamHI* linearisiert und als Matrize für eine *in vitro*-Transkription mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet (Riboprobe *in vitro* Transcription Systems, Fa. Promega).

Zur Hybridisierung wurden 500  $\mu$ l der in Ethanol aufbewahrten einzelsträngigen RNA durch Zentrifugation gefällt, das getrocknete Pellet in 30  $\mu$ l PIPES-Puffer (pH 6,4) in Gegenwart von 80 % Formamid, 400 mM NaCl und 1 mM EDTA aufgenommen, jeweils 15  $\mu$ l der komplementären Einzelstränge zusammengegeben und für 10 min auf 85°C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C über Nacht inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Um reine dsRNA zu erhalten, wurden die einzelsträngigen RNAs durch einzelstrangspezifische RNasen abgebaut. Hierzu wurden zu allen Ansätzen in 300  $\mu$ l Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl und 5 mM EDTA 1,2  $\mu$ l RNaseA (10 mg/ml) und 2  $\mu$ l RNaseT1 (290  $\mu$ g/ml) zugegeben. Die Ansätze wurden 1,5 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die RNasen durch Zugabe von 5  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) und 10  $\mu$ l 20% SDS und Inkubation für 30 min bei 37°C denaturiert. Die dsRNA wurde durch Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 15  $\mu$ l TE-Puffer, pH 6,5 aufgenommen.

Testsystem mit menschlichem Zellkernextrakt:

Unter Verwendung des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega wurde die Transkriptionseffizienz des oben angegebenen DNA-Fragments ("positive control DNA") in Gegenwart der beiden einzelsträngigen Oligoribonukleotide sowie der dsRNA bestimmt. Dies erfolgte anhand der in die "run off"-Transkripte inkorporierten Radioaktivität des als Substrat verwendeten [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] GTP. Die Trennung des freien GTP vom entstandenen Transkript wurde mittels Gelelektrophorese vorgenommen. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe eines Radioaktivitätsdetektors (Instant-Imager).

#### Ergebnis und Schlussfolgerung:

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von dsRNA im Vergleich zum Kontrollansatz ohne RNA sowie auch zu den Ansätzen mit einzelsträngiger RNA. Die Wirksamkeit der dsRNA war schon bei Zugabe von geringen Mengen (ca. 1  $\mu\text{g}$ ) zu erreichen. Der hemmende Effekt einzelsträngiger Antisinn-RNA wäre in diesem Testsystem nicht nachzuweisen, da hierbei die Inhibition auf der Ebene der Translation stattfindet. Hier wurde die Transkription untersucht. Die hiermit erstmals beim Menschen beobachtete Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA zeigt deutlich eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

## Literatur:

Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M.  
 (1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation ei-  
 5 nes DNA-Duplexes durch *cis-trans*-Isomerisierung einer  
 Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* **111**, 2547-2549.

Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtti,  
 A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of dou-  
 ble helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids*  
 10 *Res.* **25**, 4954-4961.

Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998). The 2-5A sy-  
 stem in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmaco-*  
*ther.* **52**, 386-390.

Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya,  
 15 T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M.  
 & Shabarova, Z.A. (1993). Oligonucleotide circularizati-  
 on by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids*  
*Res.* **21**, 5403-5407.

Expert-Bezancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise  
 localization of several covalent RNA-RNA cross-link in  
*Escherichia coli* 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* **136**, 267-274.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver,  
 S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic  
 interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis*  
 25 *elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995). Circulaiza-  
 tion of oligonucleotides by disulfide bridge formation.  
*Nucl. Acids Res.* **23**, 2025-2029.

Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993). Template controlled coupling and recombination of oligonucleotide blocks containing thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1403-1408.

5 Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11693-11695.

10 Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. In *Methods in Enzymology* Anonymous pp. 330-341.

15 Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W. (1998). Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6910-6920.

Micura, R. (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-phase synthesis. *Chem. Eur. J.* **5**, 2077-2082.

20 Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup>. *Nucl. Acids Res.* **24**, 509-514.

25 Wang, S. & Kool, E.T. (1994). Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2326-2333.

Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* **35**, 6491-6499.

5      Watkins, K.P. & Agabian, N. (1991). *In vivo* UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome trans-splicing. *Genes & Development* **5**, 1859-1869.

Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* **32**, 301-310.

10      Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R. (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* **5**, 2705-2720.

15

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
2. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein Vektor zur Kodierung von Oligoribonukleotiden (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.



5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.
- 5 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 30 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet wird.

5

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet wird.

10

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert sind.

15

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

20

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.

25

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

30

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt wird.

5

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.

10

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanaloge gebildet wird.

15

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereiche eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird.

20

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

25

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

30

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.
- 5
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 10
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.
- 15
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
- 20
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 25
30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 30
31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 5 33. Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.
- 10
34. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung von Oligoribonukleotiden (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.
- 15
35. Medikament nach Anspruch 33 oder 34, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 20
36. Medikament nach Anspruch 33 oder 35, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 25
37. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.
- 30 38. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.

39. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 38, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.

5

40. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

10

41. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 40, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

42. Medikament nach Anspruch 41, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

15

43. Medikament nach Anspruch 41, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

20

44. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 43, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

25

45. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 44, wobei der komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

30

46. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 45, wobei der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen, RNA-Einzelstrangs gebildet ist.

47. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 46, wobei der komplementäre Bereich aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet ist.
- 5 48. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 47, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert ist.
- 10 49. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 48, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 15 50. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 49, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
- 20 51. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 50, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.
- 25 52. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 51, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt ist.
- 30

53. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 52, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.

54. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 53, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet ist.

55. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 54, wobei die chemische Verknüpfung durch in die komplementären Bereiche eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.

56. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 55, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

57. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 56, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N`-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

58. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 57, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.



59. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 58, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Tripelhelix-Bindungen sind.

5 60. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 59, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.

10

61. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 60, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

15

62. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 61, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

20

63. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 62, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

25

64. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 63, wobei die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

30

65. Medikament nach einem der Ansprüche 33 bis 64, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

66. Verwendung eines Oligoribonukleotids (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen

Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.

5 67. Verwendung eines Vektors zur Kodierung Oligoribonukleotide (dsRNA) mit doppelsträngiger Struktur zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

10 68. Verwendung nach Anspruch 66 oder 67, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.

15 69. Verwendung nach Anspruch 66 oder 68, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.

20 70. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 69, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.

25 71. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 70, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.

30 72. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 71, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.

73. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 72, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

74. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 73, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

5 75. Verwendung nach Anspruch 74, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

10

76. Verwendung nach Anspruch 74, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

77. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 76, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

15

78. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 77, wobei der komplementäre Bereich aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet ist.

20

79. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 78, wobei der komplementäre Bereich aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet wird.

25

80. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 79, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert sind.

30

81. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 80, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in

der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5 82. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 81, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.

10 83. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 82, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.  
15

84. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 83, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs hergestellt ist.  
20

85. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 84, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.  
25

86. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 85, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet ist.  
30

87. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 86, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereiche eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet ist.
- 5 88. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 87, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.
- 10 89. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 88, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 15
90. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 89, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
- 20
91. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 90, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.
- 25
92. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 91, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
- 30

93. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 92, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
- 5 94. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 93, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 10 95. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 94, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 15 96. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 95, wobei die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 20 97. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 96, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 25 98. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 97, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapierenden Organismus injizierbar ist.
- 30 99. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 98, wobei die dsRNA bzw. der sie kodierende Vektor in Bakterien oder Mikroorganismen aufgenommen sind.
100. Verwendung nach einem der Ansprüche 66 bis 99, wobei der komplementäre Bereich höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid (dsRNA) mit doppelsträgiger Struktur zur  
5 Hemmung der Expression eines Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.